

JP6118083 A
IMMUNOLOGICAL MEASURING METHOD USING GOLD COLLOID
GODO SHUSEI KK

Abstract:

PURPOSE: To provide an immunological measurement method by aggregation in which the effect of prozone phenomenon is eliminated, and allow the measurement regardless of which area of antibody excessive area and antigen excessive area the measurement value belongs to.

CONSTITUTION: In an immunological measurement method by gold colloid aggregation, an antigen material is again added after the measurement after a fixed time reaction, and it is determined which excessive area of antigen and antibody the reaction belongs to, whereby the measuring range is extended. A small quantity of antigen is preliminarily added to the reaction system to extinguish the antibody excessive area, whereby the reaction is measured as the reaction in only the antigen excessive area. The measurement is conducted by measuring the absorptivity after a fixed time reaction, the difference (or ratio) of absorptivity in two points of time after reaction start, the reducing speed of absorptivity in the reaction initial stage, or the difference in absorptivity in two wavelengths.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

Inventor(s):

NAGATA MASATO
KONDO HIDEHIKO
TANAKA TORU

Application No. JP199286197A **Filed** 19920310 **Published** 19940428

Original IPC(1-7): G01N0033557

G01N003350 G01N0033543 G01N0033553

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-118083

(43)公開日 平成6年(1994)4月28日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/557		9015-2 J		
33/50		7055-2 J		
33/543	E	9217-2 J		
33/553		9015-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平4-86197

(22)出願日 平成4年(1992)3月10日

(71)出願人 000170473

合同酒精株式会社

東京都中央区銀座6丁目2番10号

(72)発明者 永田 正人

千葉県松戸市上本郷字仲原250番地 合同
酒精株式会社中央研究所内

(72)発明者 近藤 英彦

千葉県松戸市上本郷字仲原250番地 合同
酒精株式会社中央研究所内

(72)発明者 田中 徹

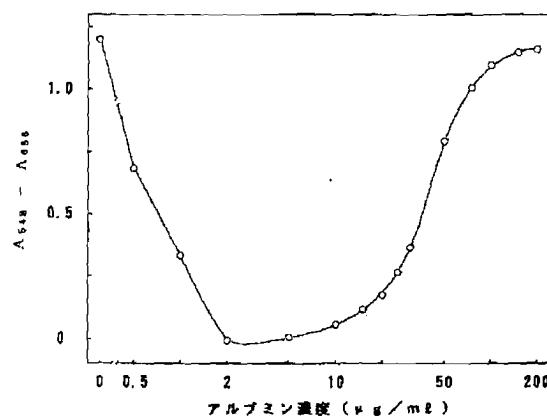
千葉県松戸市上本郷字仲原250番地 合同
酒精株式会社中央研究所内

(54)【発明の名称】 金コロイドを用いる免疫学的測定法

(57)【要約】

【構成】 金コロイド凝集法による、免疫学的測定法において、一定時間反応後の測定の後、さらに抗原物質を再添加し、その後の反応の進行の有無により、反応が抗原あるいは抗体の、いずれの過剰域にあるかを決定することにより、測定範囲を拡大する。また、予め少量の抗原を反応系に添加して、抗体過剰域を消失させておくことにより、抗原過剰域のみの反応として測定する。測定は、一定時間反応後の吸光度、反応開始後の2時点における吸光度の差(または比)、あるいは反応初期における吸光度の減少速度、2波長における吸光度の差等を測定することにより行う。

【効果】 プロゾーン現象の影響を排除した、凝集法による免疫学的測定法が提供され、従来法の如く、測定値が抗体過剰域にあるか、抗原過剰域にあるかには無関係に、測定することが可能となった。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗体を結合した金コロイドの溶液に、抗原を添加して反応させ、吸光度の減少または吸光度の減少速度から、抗原の濃度を測定する方法。

【請求項2】 請求項1における抗原の測定域が、抗原過剰域であることを特徴とする抗原濃度測定方法。

【請求項3】 請求項1の測定方法において、予め反応系に抗原を添加して抗体過剰域を消失させ、測定域を抗原過剰域として、抗原濃度を測定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、生体成分の免疫学的分析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術およびその問題点】 生体成分あるいは体液の微量分析法として、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、免疫比濁法、ネフロメトリー法、ラテックス凝集法等の、種々の免疫学的測定方法が知られている。しかしRIAでは、放射性アイソトープを用いるため、特殊な設備を必要とし、またEIAでは、反応ステップが多く、操作が煩雑となり、さらに反応時間も長い等の問題点がある。

【0003】 免疫比濁法とネフロメトリー法は、溶液内で生成する沈降性の抗原抗体複合物を、光学的に測定する方法で、両者とも操作は簡単で、測定時間も短く、優れた方法である。この2つの方法においては、濁度の測定方法が異なるだけで、本質的な差異はないが、いずれも専用の測定装置を必要とするものである。一般に、免疫比濁法等の凝集法では、抗体量に対して抗原量が多いとき、抗原抗体複合物の生成は、抗原量に依存して増大するが、ある抗原量で複合物の生成は極大となり、さらに抗原量が増加した抗原過剰域においては、逆に複合物の生成は減少し、いわゆるプロゾーン現象と呼ばれる状況が発生する。そのため測定した値が、極大値の前にあるのか後にあるのかの、判別が必要となり、測定機器には、プロゾーン現象のチェック機構を組み込むことが、不可欠となるため、複雑で高価なものとなった。

【0004】 ラテックス凝集法はポリスチレンラテックス等の、重合体の担体粒子上に結合させた抗体を、抗原と反応させ、定性的にはスライド板あるいはマイクロタイプレートを用い、粒子の凝集を肉眼的に観察して、その凝集像から抗原の有無を判定する。また、定量的には免疫比濁法と同様に、濁度を光学的に測定する。しかし、この場合も、免疫比濁法の場合と同様に、抗原過剰域ではプロゾーン現象が起こるため、測定値が陰性化する危険を免れない。以上のように、抗原抗体反応を利用する測定においては、高濃度の抗原を用いても、反応が陰性化する虞のない測定方法の出現が、強く望まれていた。

【0005】

【問題点を解決するための手段】 本発明は、金コロイド凝集法を用い、抗原過剰域における抗原の測定に、改良法を提供しようとするものである。金コロイド凝集法は、抗体を結合させる担体粒子として、金コロイドを用いた粒子凝集法の1種であるが、凝集することにより反応液の色調が、大きく変化するので、色調の変化を目視で判定することにより、定性的に抗原を検出できる。また、吸光度を測定することにより、抗原濃度を定量することもできる。定量するには、既知濃度の抗原の標準曲線から、検体中の抗原濃度を算出することによって行う。吸光度の測定は、520-580nm、好ましくは530-550nmの波長の範囲で実施し、一定時間反応させた後の吸光度の値、または反応開始後の2時点の吸光度の差から、あるいは反応初期に減少する吸光度の、単位時間あたりの変化量から、抗原濃度を求めることができる。さらに、520-580nmの1波長における吸光度と、600-800nmの1波長における吸光度からも、測定することができる。

【0006】 前述したように、抗原と、抗体あるいは担体粒子上の反応では、抗体過剰域から最適比域にかけての領域では、抗原量を増加させるに従って、抗原抗体反応による複合体の生成は増加するが、ある抗原濃度を超えると、生成量は徐々に減少し、ついには反応しなくなる。従来の抗原抗体反応を利用した測定法は、抗体過剰域から最適比域までの範囲で、反応を行わせるものであった。本発明は、従来の測定法では利用されていない反応域である、抗原過剰領域における反応、すなわち、プロゾーン現象を利用するものである。抗原と抗体の最適比域から抗原過剰域にかけては、抗原量の増加に伴い、抗体過剰域とは逆に反応生成物は減少するが、反応生成物を測定することにより、抗原を定量することは可能である。抗原が、抗体過剰域にあるのか、抗原過剰域にあるのかの判定は、反応後に抗原を再添加することにより、明かとなる。すなわち、再添加によって、反応がさらに進んだら、試料中の抗原は抗体過剰域にあり、それ以上反応しなかったら、抗原過剰域にあるものと判断される。また、抗原抗体反応を引き起こすのに、十分な量の抗原を、予め反応液中に添加し、抗原過剰域だけの反応とし、試料中の抗原量を測定することも可能である。

【0007】 金コロイド凝集法においては、抗体過剰域から最適比域にかけては、抗原濃度の増加に従い、520-580nmにおける吸光度の減少がみられ、この吸光度あるいは吸光度の減少速度を測定することにより、抗原濃度を定量することができる。一方、抗原過剰域では、抗原濃度の増加に従い、吸光度の低下は減少し、抗原を定量することができる。本発明において使用する抗体は、ポリクローナル抗体が適しているが、アミノ酸の重複配列・重複構造を有する抗原、あるいは多量体を形成する抗原に対しては、1種類のモノクローナル抗体が使用できる。また、2種類以上のモノクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を混合して、

使用することも可能である。混合使用する場合は、金コロイドに2種の抗体を同時に結合させても、あるいは別々に結合させた後、混合しても差し支えない。抗体を結合させる担体としては、平均粒径20-100nmの金コロイドを用いるのが好適であるが、金コロイドと抗体との結合方法は公知であり、例えば、金コロイドはFransの方法(Nature Phys. Sci., vol. 241, p. 20-22 (1973))によって作製でき、結合は、Geoghegan & Ackermanの方法(J. Histochem. Cytochem., vol. 25, p. 1187-1200 (1977))で、容易に行うことができる。また、抗体結合金コロイドと抗原との反応温度、反応pH、緩衝液の種類や共存する塩の種類、塩濃度等の諸条件は、これまでの抗原抗体反応となら変わるところはない。反応の促進のために、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、デキストラン等の高分子重合体を、反応系に添加することも効果がある。

【0008】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。

【0009】

実施例1 (モノクローナル抗体結合金コロイドの調製) ヒト血清から、アルブミンをブルー・セファロースを用いたカラムクロマトグラフィーで精製し、これを免疫原としてBalb/cマウスに免疫した。脾細胞とミエローマ細胞株P3U1との細胞融合を行い、ELISA法により抗体をスクリーニングして、抗アルブミン・モノクローナル抗体を10種類得た。それぞれの抗体はマウス腹水から、プロテインA・セファロースにより精製し、Frensの方法で調製した平均粒径50nmの金コロイドに、Geoghegan & Ackermanの方法によって、コロイド1mlあたり5 μ gを結合させた。遠心分離により、抗体を結合した金コロイドを回収し、1%ウシ・アルブミンを含有するリン酸緩衝化生理食塩水(pH 7.2)に溶解して、540nm、光路長1cmにおける吸光度が約5.5となるように、濃度を調整した。96ウェ

ルマイクロタイタープレートを用い、抗体結合金コロイド100 μ lと、1 μ g/mlのヒト・アルブミン溶液50 μ lを混合し、30分間放置した結果、抗体番号HA0304およびHA0819を結合した金コロイドが凝集を示し、赤紫色から灰色へと色調が変化した。抗原との凝集性は、HA0304の方が強かった。

【0010】

実施例2 (マイクロタイタープレートを用いた測定) 各濃度のヒト・アルブミン溶液を、1%ウシ・アルブミンを含むリン酸緩衝液(pH7.2)を用いて調製し、その25 μ lと、実施例1で得たHA0304抗体結合金コロイド100 μ l、および10%ポリエチレングリコール6000の25 μ lを、96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに注加し、軽く振盪した。20分後に、バイオラッド社製3550型プレートリーダーを用いて、540nmと655nmの吸光度の差(2波長測定値)を測定した。その結果は、図1に示した。抗体過剰域であるアルブミン濃度0-2 μ g/mlでは、抗原濃度の増加に従って、吸光度は低下したが、アルブミン濃度が2 μ g/mlを超える抗原過剰域では、抗原濃度の増加に従って、吸光度は低下しなくなった。

【0011】尿中のアルブミン濃度を測定する目的で、アルブミン溶液の代わりに尿の25 μ lを、HA0304抗体結合金コロイド100 μ lと反応させて、表1に示した吸光度の値が得られた。これらの吸光度の値からだけでは、試料中のアルブミンが、抗原過剰域にあるのか、抗体過剰域にあるのか区別できないため、吸光度測定後のウェルに、2 μ l/mlのアルブミン溶液を10 μ l添加して、5分間放置し、再度吸光度を測定し、凝集反応が促進するかどうかを観察した。その結果、試料番号3だけが、抗体過剰域にあり、その他は抗原過剰域にあると判定されたので、図1の標準曲線をもとに、1回目の吸光度測定値から、試料中のアルブミン濃度を算出した。

【0012】

【表1】

表1: 尿中アルブミンの定量 (マイクロタイタープレート)

試料番号	吸光度	抗原追加後の凝集	抗原濃度(μ g/ml)
1	0.046	-	9.2
2	0.028	-	7.4
3	0.361	+	0.9
4	0.353	-	29.5
5	0.002	-	5.0
6	0.950	-	65.5
7	0.113	-	15.0
8	0.428	-	36.5
9	1.131	-	127.0
10	0.294	-	26.5

【0013】実施例3 (吸光度の減少速度による測定) 光路長1cmの1ml容のキュベットにリン酸緩衝液(pH 7.0) 680 μ lを入れ、1%ウシ・アルブミンを含むリン酸緩衝液

(pH 7.0)を用いて調製した、各濃度のヒト・アルブミン溶液20 μ lを、実施例1で用いたHA0304抗体結合金コロイドの300 μ lと、37℃で反応させて、波長546nmにおけ

る吸光度を、6秒間隔で5分間測定した。測定結果は、図2に示したが、横軸(x軸)は抗原濃度、縦軸(y軸)は1分間あたりの吸光度の最大減少速度を示している。吸光度の減少速度が最大となる時間は、抗原濃度によって異なり、抗原濃度が高いほど早く、低くなるに従い遅くなるので、最大速度に達した時間によって、抗原が抗原過剰域にあるのか、抗体過剰域にあるのかを判別できるが、

約80秒以下にあれば抗原過剰域にあると判定する。上記のアルブミン溶液に代えて、尿を用いて反応させ、尿中のアルブミン濃度を測定する実験を行い、表2の結果を得た。

【0014】

【表2】

表2：尿中アルブミンの定量(最大減少速度法)

試料番号	吸光度最大減少速度 ($\Delta A/\text{Min.}$)	最大速度到達時間 (sec.)	抗原濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
1 1	0. 1 4 3	1 3 8	9. 6
1 2	0. 0 6 6	2 0 4	7. 0
1 3	0. 2 4 8	7 2	3 1. 8
1 4	0. 2 3 2	9 0	1 6. 2
1 5	0. 2 2 9	6 0	5 8. 5

【0015】

実施例4 (抗原過剰域にある尿中アルブミンの定量)
1 $\mu\text{g/ml}$ のヒト・アルブミンを含有するリン酸緩衝液(pH 7.0)を、緩衝液として使用する他は、実施例3と同一の条件で反応を行った。標準曲線を図3に結果を示した

が、抗原濃度を横軸(x軸)に、反応開始直後と3分後の吸光度の差(2ポイント測定値)を縦軸(y軸)に示している。尿中のアルブミンを測定した結果を、表3に示した。

【0016】

【表3】

表3：尿中アルブミンの定量法(抗原過剰域における2ポイント測光法)

試料番号	吸光度	抗原濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
1 6	0. 3 9 6	8. 6
1 7	0. 3 7 8	2 1. 0
1 8	0. 3 2 7	5 6. 2
1 9	0. 4 0 4	3. 1
2 0	0. 3 8 2	1 8. 3

【0017】

【発明の効果】従来の免疫学的測定法においては、プロゾン現象のため、測定値が抗体過剰域にあるか、抗原過剰域にあるかにより、真の値を示しているか否か、直ちに判定できなかったが、本発明の結果、これらに関係なく測定することが可能となった。

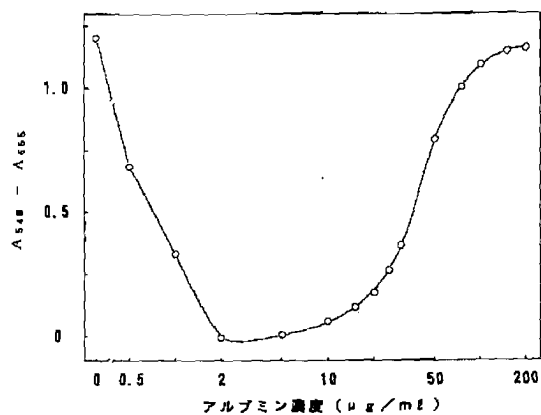
【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト・アルブミン測定における標準曲線を示す。横軸(x軸)は、アルブミン濃度($\mu\text{g/ml}$)を、縦軸(y軸)は、540nmおよび655nmにおける吸光度の差を表している。

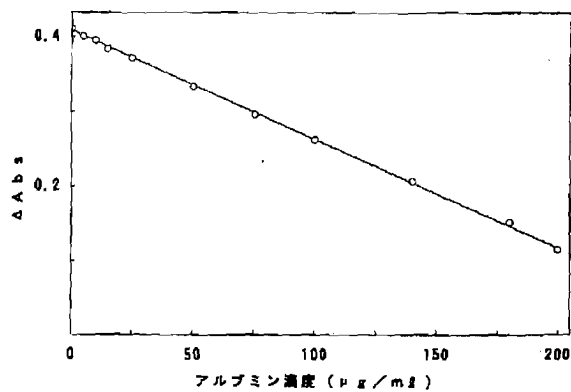
【図2】ヒト・アルブミン測定における抗原(アルブミン)濃度と、単位時間における吸光度の最大減少速度の関係を示す。横軸(x軸)は、アルブミン濃度($\mu\text{g/ml}$)を、縦軸(y軸)は、546nmにおける1分間あたりの吸光度の最大減少値を表している。

【図3】ヒト・アルブミン測定における抗原(アルブミン)濃度と、反応開始後一定時間における吸光度の減少値の関係を示す。横軸(x軸)は、アルブミン濃度($\mu\text{g/ml}$)を、縦軸(y軸)は、546nmにおける反応開始直後と3分間後の吸光度の差を表している。

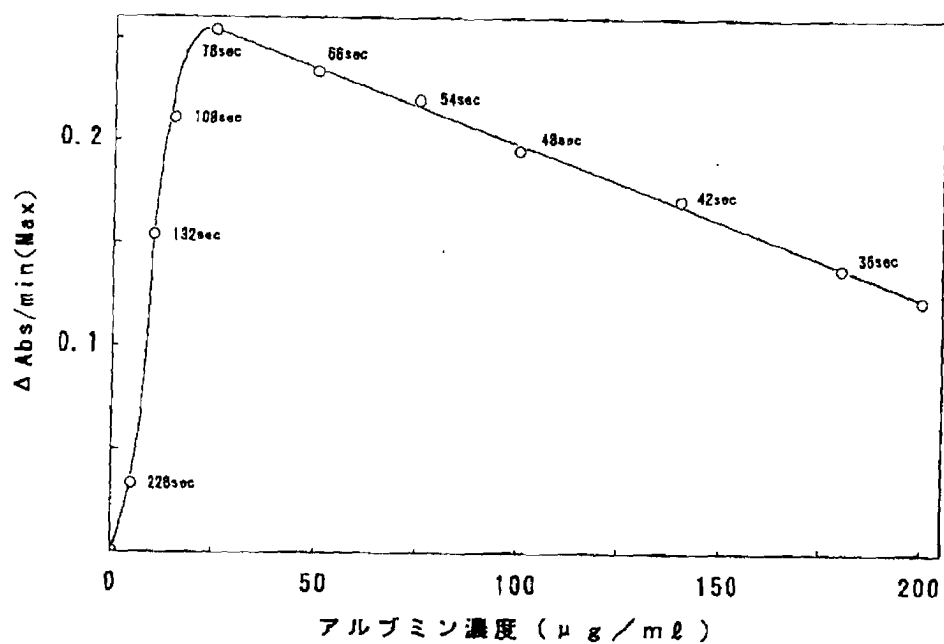
【図1】



【図3】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成5年9月28日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】 金コロイドを用いる免疫学的測定法